

50524  
64



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE  
LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis*  
SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A  
**SARAI MANCERA ISLAS**



MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA VETERINARIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I.P.N, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. en C. MARÍA DE JESÚS DE HARO CRUZ Y LA ASESORÍA DEL Dr. en C. FERNANDO M. GUERRA INFANTE Y EL Q.B.P GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS.

MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003.



## **HUELLAS EN LA ARENA.**

Una noche soñé que caminaba a lo largo  
de una playa acompañado por Dios.

Durante la caminata muchas escenas de mi vida  
fueron proyectándose en la pantalla del cielo.

Según iba pasando cada una de esas escenas,  
notaba que unas huellas se formaban en la arena.

A veces aparecían dos pares de huellas,  
otras solamente aparecía un par de ellas.

Esto me preocupó grandemente por que puede notar que  
durante las escenas que reflejaban etapas tristes en mi vida,  
cuando me hallaba sufriendo de angustias, penas o derrotas  
solamente podía ver un par de huellas en la arena.

Entonces le dije a Dios:

"Señor, tú me prometiste que si te seguía tú caminarías siempre a mi lado,  
sin embargo, he notado que durante los momentos más difíciles de mi vida  
sólo había un par de huellas en la arena."

¿Porqué cuando más te necesitaba no estuviste a mi lado?..

El Señor me respondió:

"Las veces que has visto sólo un par de huellas en la arena  
hijo mío, ha sido cuando te he llevado en mis brazos."



## DEDICATORIA.

- ❖ A mis padres por darme la herencia más valiosa, la educación, pero sobre todo a mi madre por todas las oraciones que elevó a Dios durante mis años escolares y que hoy día aún sigue haciendo por mí.
- ❖ A "Lulusa", mi querida hermana, que siempre ha estado a mi lado apoyándome con sus oraciones y sus consejos y quien es un gran ejemplo de tenacidad y entereza para mí.
- ❖ A mi cuñado Guty, por su nobleza y disposición de brindar ayuda a quien la necesite, así como por todo su apoyo y asesoría cuando el equipo de cómputo "entra en receso."
- ❖ Con todo mi cariño a mis sobrinos Saira y Guty, quienes llenan cada momento de mi vida con esa alegría tan singular que sólo los niños poseen.
- ❖ A mis queridos amigos: María de Jesús (mi estupenda directora), Rosalba Cervantes, Judith, Sara (mi magnífica morá), Alejandra, Lilián, Alma, Moshé y Gerardo, por sus consejos, su amistad sincera e incondicional y su constante interés en el avance y desarrollo de éste proyecto, así como por todo lo que ha compartido cada uno de ellos conmigo.
- ❖ Por último pero no por ello menos importante, a Otzar mi querida mascota que durante las noches de estudio y trabajo en ésta tesis me brindó su cálida compañía.



## AGRADECIMIENTOS.

- ❖ No hay palabras con las cuales pueda agradecer a mi Padre Celestial el haberme permitido alcanzar esta meta, ya que sin su ayuda no lo hubiera logrado, pues Él es quien día a día me fortalece y quien en los momentos más difíciles está a mi lado sosteniéndome con su diestra y dándome ánimo a través de su palabra, por esto y por todas las bendiciones que me ha concedido, sólo puedo decir desde el fondo de mi corazón y con una enorme gratitud, gracias, muchas gracias Señor.

*Todo lo puedo en Yeshúa que me fortalece.*

*Fil. 4:13*

- ❖ Este trabajo presenta el concepto que tan claramente supo transmitirme la M. en C. María de Jesús De Haro, quien con una gran calidad científica dirigió este proyecto. Estoy en deuda con ella por su benevolencia en compartir conmigo sus conocimientos y su amistad, así como por su ejemplificación de lo que una química debe ser por excelencia.
- ❖ No puedo expresar adecuadamente mi gratitud al Dr. en C. Fernando Guerra por su revisión a este escrito, su escrupulosidad al examinar cada línea aclarando y corrigiendo ideas y por su apoyo a la realización de este trabajo proveyendo de todo el material necesario y dedicando horas de su precioso tiempo.
- ❖ Mi agradecimiento a la Q.F.B. Rosalba Cervantes, al Q.B.P. Gustavo Miranda y al M. en C. Angel García, por su apoyo inquebrantable, sus observaciones y sus valiosos comentarios que sirvieron como pilares de ésta tesis.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

ÍNDICE GENERAL.

Índice General.	i
Índice de Tablas.	iii
Índice de Figuras	iv
Glosario de abreviaturas.	v
Resumen.	vii
<b>1. Introducción.</b>	
1.1. Participación de la respuesta inmune humoral en la eliminación de la infección por <i>C. trachomatis</i> .	1
<b>2. Marco Teórico.</b>	
2.1. Características generales del género <i>Chlamydia</i> .	3
2.2. Complicaciones producidas en infecciones agudas y crónicas por <i>C. trachomatis</i> .	6
2.3. Empleo del ratón como modelo de investigación en la infección por <i>C. trachomatis</i> .	8
2.4. Respuesta inmune del huésped durante la infección por <i>C. trachomatis</i> .	11
<b>3. Planteamiento del problema.</b>	16
<b>4. Objetivos.</b>	
4.1. Objetivo general.	17
4.2. Objetivo específico.	17
<b>5. Hipótesis.</b>	17
<b>6. Diseño de investigación.</b>	
6.1. Tipo de estudio.	18
6.2. Población.	18
6.3. Criterios.	18
<b>7. Material y métodos.</b>	
7.1. Inoculación experimental de ratonas con <i>C. trachomatis</i> .	19
7.2. Toma de muestra cervicovaginal.	19
7.3. Detección de cuerpos elementales en las muestras cervicovaginales.	19
7.4. Toma de muestra sanguínea.	20
7.5. Técnica para citometría de flujo.	20
7.6. Técnica de inhibición de fluorescencia.	21
<b>8. Análisis estadístico.</b>	22
<b>9. Resultados.</b>	
9.1. Presencia de cuerpos elementales en muestras vaginales de ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> .	23
9.2. Determinación de anticuerpos en el plasma de ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> .	26
9.3. Determinación del porcentaje de inhibición de fluorescencia en el plasma de ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> .	32

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

9.4 Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos TCD4, TCD8 y B por citometría de flujo.	35
<b>10. Discusión.</b>	<b>38</b>
<b>11. Conclusiones.</b>	<b>44</b>
<b>12. Referencias.</b>	<b>45</b>
<b>13. Apéndice I Reactivos.</b>	<b>53</b>
<b>14. Apéndice II Técnicas.</b>	<b>55</b>

ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Espectro clínico de infecciones causadas por <i>C. trachomatis</i> .	4
<b>Tabla 2.</b> Presencia de cuerpos elementales en el exudado vaginal de ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> .	23
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de infección vaginal de animales inoculados con <i>C. trachomatis</i> a diferentes tiempos postinoculación.	24
<b>Tabla 4.</b> Detección de anticuerpos anti- <i>Chlamydia trachomatis</i> en el plasma de ratonas inoculadas.	27
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de inhibición de fluorescencia en el plasma de ratonas inoculadas y no inoculadas con <i>C. trachomatis</i> a diferentes tiempos postinoculación.	33
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de linfocitos TCD4, TCD8 y B en ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> a diferentes tiempos de inoculación.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Muestras cervicovaginales de ratonas no inoculadas e inoculadas con <i>C. trachomatis</i> .	
<b>A.</b> Exudado vaginal de ratona no inoculada.	25
<b>B.</b> Exudado vaginal de ratona inoculada.	25
<b>Figura 2.</b> Detección de anticuerpos contra <i>C. trachomatis</i> en el plasma de ratonas inoculadas 28	
<b>Figura 3.</b> Detección de anticuerpos anti- <i>Chlamydia</i> en plasma de ratonas no inoculadas e inoculadas con <i>C. trachomatis</i> .	
<b>A.</b> Inhibición de fluorescencia en plasma, control negativo anti- <i>Chlamydia</i> .	29
<b>B.</b> Inhibición de fluorescencia en plasma, control positivo anti- <i>Chlamydia</i> .	29
<b>C.</b> Inhibición de fluorescencia en plasma de ratona no inoculada con <i>C. trachomatis</i> .	30
<b>D.</b> Inhibición de fluorescencia en plasma de ratona inoculada con <i>C. trachomatis</i> a los 7 días postinoculación.	30
<b>E.</b> Inhibición de fluorescencia en plasma de ratona inoculada con <i>C. trachomatis</i> a los 30 días postinoculación.	31
<b>Figura 4.</b> Porcentajes de inhibición de fluorescencia en plasma de ratonas inoculadas y no inoculadas durante la infección por <i>C. trachomatis</i> .	34
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de linfocitos CD4 en ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> durante la infección.	36
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de linfocitos CD8 en ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> durante la infección.	37
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de linfocitos B en ratonas inoculadas con <i>C. trachomatis</i> durante la infección.	37

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

ATP = Adenosin trifosfato.

EPI = Enfermedad pélvica inflamatoria.

CD4 = Células T CD4

CD8 = Células T CD8

CITS = Clínicas de infecciones de transmisión sexual.

IgM = Inmunoglobulina M.

IgG = Inmunoglobulina G.

IgA = Inmunoglobulina A

hsp = Proteína de choque térmico.

C-hsp = Proteína de choque térmico de *C. trachomatis*.

kDa = kiloDaltons.

DNA = Ácido desoxirribonucleico.

RNA = Ácido ribonucleico

CE = Cuerpos elementales.

CR = Cuerpos reticulares.

CI = Cuerpos de inclusión.

LPS = Lipopolisacárido.

MOMP = Proteína principal de membrana externa.

UNG = Uretritis no gonococcica.

UPG = Uretritis postgonococcica.

LGV = Linfogramuloma venéreo.

**MoPn = Agente causal de neumonitis en el ratón, biovar murina de *C. trachomatis*.**

**GPIC = Agente causal de la conjuntivitis de inclusión en cobayos.**

**LPMN = Leucocitos polimorfonucleares.**

**MHC II = Complejo principal de histocompatibilidad clase II.**

**MHC I = Complejo principal de histocompatibilidad clase I.**

**IFN- $\gamma$  = Interferón gamma.**

**IL-2 = Interleucina 2.**

**IL-6 = Interleucina 6.**

**UFI = Unidades formadoras de inclusión.**

**IF = Inmunofluorescencia.**

**IFA = Inmunofluorescencia indirecta**

**MIF = Micro-inmunofluorescencia.**

**FITC = Isotiocianato de fluoresceína.**

**PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.**

## RESUMEN.

*Chlamydia trachomatis* ha sido reconocida como el patógeno más frecuente hallado en casos de infecciones de transmisión sexual, encontrándose que el establecimiento de la infección induce una respuesta específica de anticuerpos contra el microorganismo siendo estos principalmente de tipo IgM e IgG. Sin embargo, el papel de la respuesta inmune humoral que se ha estudiado en modelos murinos con cepas de origen humano no se conoce del todo, por lo que no se puede establecer el grado de susceptibilidad a las cepas humanas en las ratonas dificultando así la extrapolación a modelos humanos, de ahí que el objetivo de este trabajo fue determinar la participación de la respuesta humoral en la eliminación de la infección producida por el serotipo humano de *C. trachomatis* D UW/C3X (productor de tracoma). Para ello se inocularon 6 ratonas BALB/c por vía vaginal con el serotipo antes mencionado, a cada animal se le determinó la presencia de la infección así como niveles de anticuerpos anti-*Chlamydia* (mediante la técnica de inhibición de fluorescencia) y la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos principalmente CD4, CD8 y B (por citometría de flujo) durante el desarrollo de la infección. Los resultados mostraron la presencia de anticuerpos a partir del día 7 postinoculación y un aumento a los 21 días postinfección ( $p \leq 0.05$ ), mientras que las subpoblaciones de linfocitos no mostraron cambios significativos. Aunque la mayoría de los estudios describen que la respuesta inmune celular es la más importante para la resolución de una infección por *C. trachomatis*, los resultados obtenidos en este estudio demuestran una participación de los anticuerpos mediante un aumento de estos durante la infección, los cuales podrían ser la causa de la eliminación de la bacteria.

## 1. INTRODUCCIÓN.

*Chlamydia trachomatis* es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado en las infecciones de transmisión sexual, causante de padecimientos como tracoma, cervicitis, uretritis, epididimitis y enfermedad pélvica inflamatoria (EPI). Se ha asociado a embarazos ectópicos y pérdida fetal, por lo cual se ha convertido en un microorganismo importante dentro del área de salud pública.<sup>(1)</sup>

La prevalencia de *C. trachomatis* a nivel mundial es diversa, dependiendo de la población estudiada y de la técnica de diagnóstico empleada; no obstante se considera que ésta oscila entre el 4 y 9% en mujeres asintomáticas y del 20% en mujeres que asisten a las clínicas de infecciones de transmisión sexual (CITS), en mujeres embarazadas la prevalencia se encuentra entre el 2 y 26%<sup>(1,2)</sup>

En México se ha visto una prevalencia del 4 al 10% en mujeres asintomáticas, 16% en mujeres que asisten a CITS y 15.5% en mujeres embarazadas que muestran infecciones cervicovaginales.<sup>(2)</sup> Algunos factores de riesgo que han sido asociados para la adquisición de la infección son promiscuidad sexual, nivel socioeconómico bajo, parejas sexuales con historias previas de infección de transmisión sexual y mujeres que utilizan anticonceptivos orales.<sup>(3-5)</sup>

### 1.1. PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA ELIMINACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *C. trachomatis*.

Se ha observado durante la infección por *C. trachomatis* la inducción de una respuesta de anticuerpos, principalmente de tipo IgM e IgG específicos contra el microorganismo<sup>(6)</sup> y a la proteína de choque térmico de 60 kDa de *C. trachomatis*

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO**

---

(Chsp 60) la cual presenta una homología entre el 48 y el 50 % con la hsp 60 humana, lo que puede originar reacciones cruzadas entre estas proteínas. Además se han demostrado elevados títulos séricos de anticuerpo anti-Chsp 60 en mujeres con EPI, infertilidad tubárica y embarazo ectópico asociados con *C. trachomatis*, lo cual sugiere que esta proteína tiene un papel importante en el desarrollo de una autoinmunidad órgano específica y en la patogénesis de la infección por este microorganismo.<sup>(7-11)</sup>

Debido a que el papel de la respuesta inmune humoral en modelos murinos no se ha establecido con cepas de *C. trachomatis* de origen humano surgió este trabajo en el que se trató de esclarecer el papel de la respuesta humoral en un grupo de ratonas infectadas con *C. trachomatis* serovar D UW/C3X a las cuales se les monitoreó el progreso de la infección por medio de la obtención de muestras vaginales, determinación de anticuerpos en plasma y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos principalmente TCD4, TCD8 y B con el fin de establecer la importancia de los anticuerpos frente a una infección por este microorganismo.

## 2. MARCO TEORICO.

### 2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Chlamydia*.

El género *Chlamydia* se caracteriza por ser una bacteria intracelular obligada que tiene tropismo por las células del epitelio mucoso, requiere del ATP celular para sobrevivir tanto en células epiteliales como en células fagocíticas, posee membrana interna y externa y ribosomas procarióticos por lo que sintetiza sus propias proteínas ácidos nucleicos y lípidos. Las especies más importantes descritas hasta hoy día y en las que el género *Chlamydia* se divide son: *C. psittaci* (afecta a las aves, rumiantes, porcinos, ratones, además de infectar al hombre), *C. pneumoniae* (patógeno del sistema respiratorio de humanos), *C. pecorum* (aislada en rumiantes y se le considera como agente causante de enteritis y encefalitis en estos mamíferos, pero no es patógena para el ser humano) y *C. trachomatis* (causa enfermedades clínicas oculares y genitales de gran importancia en el ser humano). Esta última especie presenta 15 serovariantes caracterizadas por la infección que producen y el huésped que afectan (tabla 1).<sup>(2,12,13)</sup>

TABLA 1. ESPECTRO CLINICO DE INFECCIONES CAUSADAS POR

*C. trachomatis.*

Variantes	Huésped	Infección	Complicaciones
A, B, Ba, C	Mujeres, hombres y niños	Tracoma	Ceguera
B, D-K	Mujeres	Cervicitis, uretritis, proctitis, conjuntivitis	Salpingitis, endometritis, embarazo ectópico, infertilidad, endometritis posparto
B, D-K	Hombres	Uretritis, uretritis posgonocócica, prostatitis, conjuntivitis	Epididimitis, síndrome de Reiter
B, D-K	Lactantes	Conjuntivitis, neumonía	Tracoma
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> , L <sub>3</sub>	Mujeres y hombres	Linfogranuloma venéreo	Obstrucción linfática

Datos de Bell TA, Grayston JT: Centers for Disease Control guidelines for prevention and control of *Chlamydia trachomatis* infection.

Los integrantes del género *Chlamydia* son microorganismos procariotes de tamaño muy pequeño y forma esferoidal, son bacterias Gram negativas que contienen DNA y RNA además poseen la maquinaria necesaria para todos los procesos metabólicos, sin embargo requieren del ATP celular para sobrevivir, lo cual los convierte en microorganismos intracelulares obligados.

*C. trachomatis* presenta dos formas de vida: una de estas formas es el cuerpo elemental (CE) cuyo tamaño es de 300 a 400 nm el cual se considera la forma infectiva. La integridad estructural de los CE confiere resistencia a los factores ambientales permitiéndole sobrevivir después de la lisis de la célula huésped así como durante el subsecuente tránsito de célula a célula y de huésped a huésped. La otra forma es el cuerpo reticulado (CR) el cual

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

es más grande, mide 800 a 1200 nm, su capacidad de infectar es baja, es metabólicamente activo, se encuentra de forma intracelular en el citoplasma de la célula y debido a la composición de su pared no sobrevive fuera de la célula huésped.<sup>(12)</sup>

La replicación de *C. trachomatis* se lleva a cabo a través de un ciclo de crecimiento único, el ciclo comienza con la unión del CE a las microvellosidades de las células de la mucosa vaginal, la mucosa respiratoria y la mucosa conjuntival así como células del sistema retículo endotelial (leucocitos, polimorfonucleares, monocitos y macrófagos), una vez que penetra *C. trachomatis* permanece dentro del fagosoma citoplásmico en donde se lleva a cabo el ciclo de replicación que dura de 6 a 8 horas y en donde se reorganizan en CR, los cuales se dividen repetidamente por fisión binaria. Durante la fase de replicación el fagosoma recibe el nombre de cuerpo de inclusión (CI). En un lapso de 18 a 24 horas posteriores a la infección los CR se reorganizan en CE, los cuales en 48 a 72 horas rompen a la célula y se liberan para posteriormente infectar otras células.<sup>(13)</sup>

*C. trachomatis* presenta un lipopolisacárido (LPS) termoestable que es un determinante específico de género, además de contar con la proteína principal de membrana externa (MOMP), que constituye cerca del 60 % del total de la membrana externa, y en ésta residen los determinantes antigénicos específicos de género, de especie y de subespecie.<sup>(12-14)</sup>

## 2.2. COMPLICACIONES PRODUCIDAS EN INFECCIONES AGUDAS Y CRÓNICAS POR *C. trachomatis*.

Como se mencionó anteriormente, *C. trachomatis* es la principal especie que afecta al ser humano pues es uno de los principales agentes de infecciones de transmisión sexual.

Este microorganismo ha sido aislado en el varón, en uretra, epidídimo y próstata, ocasionando en cada sitio patologías tales como: 1) uretritis no gonococcica (UNG), la cual suele presentarse con disuria y una supuración mucopurulenta escasa o abundante, 2) uretritis postgonococcica (UPG), 3) epididimitis (que ha sido relacionada como una secuela de la uretritis no gonococcica) y 4) prostatitis.<sup>(15,16)</sup>

En la mujer normalmente la secreción vaginal puede inhibir la formación de inclusiones de *C. trachomatis* hasta un 75 % a un pH de 3.5 a 4.5, sin embargo cuando se utilizan anticonceptivos orales esta inhibición disminuye hasta un 33 % ya que estos hormonales cambian el pH vaginal de ácido a alcalino favoreciendo así el desarrollo del microorganismo, el cual durante una infección aguda puede producir cervicitis mucopurulenta, uretritis y si la infección no se controla puede diseminarse a órganos genitales superiores ocasionando endometritis y finalmente enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) o salpingitis. La EPI a largo plazo puede ser causa de embarazos ectópicos y/o esterilidad.<sup>(3-5)</sup>

Se ha descrito que mujeres embarazadas con infección por *C. trachomatis* presentan alto riesgo de partos prematuros, rotura prematura de membranas, abortos espontáneos y productos de bajo peso al nacimiento.<sup>(17-19)</sup> Por otro lado neonatos a término o prematuros de mujeres infectadas con *C. trachomatis* pueden presentar bronquitis,

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

---

neumonía y conjuntivitis, la cual puede progresar hacia un tracoma, que es una de las causas de ceguera más importantes a nivel mundial. (3,20-24)

Diversos estudios que involucran a pacientes con UNG, UPG, EPI, salpingitis, infertilidad, endometritis y/o embarazos ectópicos han determinado que estos presentan una respuesta inmune humoral específica hacia *C. trachomatis* y que esta respuesta es iniciada por dos estructuras importantes del microorganismo: el lipopolisacárido (LPS) y la proteína mayor de membrana externa (MOMP). Se ha visto que primeramente se producen anticuerpos de tipo IgM alrededor de las 3 semanas posteriores al contacto con el microorganismo y que posteriormente se induce la producción de anticuerpos de tipo IgG.

Una vez establecida la infección los niveles de IgM e IgG suelen incrementarse rápidamente, subsecuentemente los anticuerpos IgM disminuyen paulatinamente quedando los de tipo IgG que permanecen elevados durante cierto tiempo para después disminuir conforme se resuelve la infección. (3,6,15,19,25,26)

### 2.3. EMPLEO DEL RATÓN COMO MODELO DE INVESTIGACIÓN EN LA INFECCIÓN POR *C. trachomatis*.

Debido a que los modelos animales pueden ayudar a elucidar el tipo de respuesta inmune frente a diferentes microorganismos, en los años 80' se inicio el empleo de ratones como modelo experimental en el estudio de *C. trachomatis*, encontrándose que la inoculación intranasal de cepas de tracoma y linfogranuloma venéreo (LGV) causan neumonitis, además de que pueden producir anticuerpos contra este microorganismo por lo que el ratón resulta ser útil para futuras investigaciones.<sup>(27)</sup>

Siendo *C. trachomatis* un microorganismo de transmisión sexual, algunos investigadores diseñaron un modelo para el estudio de infecciones genitales empleando una cepa de *Chlamydia* que causa neumonitis en el ratón (MoPn cepa No VR 123 Nigg II) y que además al ser inoculada por vía vaginal pueden detectarse inclusiones en las muestras cervicovaginales de estos animales, con una baja respuesta de anticuerpos entre el día 6 y 10 después de la infección. Esta cepa fue aislada por Nigg en 1942 a partir de ratones inoculados con una cepa de *Chlamydia* humana productora de neumonía la cual es conocida actualmente como agente MoPn o biovar murina de *C. trachomatis*, y al parecer es más virulenta para el ratón que las cepas humanas.<sup>(28-30)</sup>

Estudios de caracterización molecular de la MOMP de la biovar murina MoPn indican que el DNA del gen que codifica para ésta proteína tiene similar longitud estructural con el gen de la MOMP de *C. trachomatis* humana, lo cual sugiere que la biovar MoPn está estrechamente relacionada con el serovar humano.<sup>(29,30)</sup>

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

---

En cuanto al ciclo de replicación de este biovar es más rápido, su duración es aproximadamente la mitad del tiempo que las cepas humanas por lo cual resulta ser más prolífica; por otro lado la inoculación vaginal de la ratona con la MoPn, produce una infección que naturalmente asciende desde la vagina y el cervix (tracto genital inferior) hasta útero, oviductos y ovarios (tracto genital superior), por lo que la respuesta inflamatoria producida y las secuelas postinfección; tales como oclusión tubal, hidrosalpingitis e infertilidad son similares a las que se producen en el tracto vaginal de la mujer cuando se infecta por *C. trachomatis*.

Se ha observado también que la salpingitis producida por la inoculación directa del agente MoPn en el ovario del ratón genera una respuesta inflamatoria aguda en este órgano así como en el oviducto después de 6 a 9 días de la inoculación, los cortes histológicos muestran la presencia de neutrófilos, macrófagos y fibroblastos a los 14 días posteriores a la inoculación así como anticuerpos IgM e IgG, los cuales pueden perdurar hasta 23 días para IgM mientras que para IgG se mantienen incrementados hasta la eliminación del microorganismo, lo que indica que hay actividad por parte de la respuesta inmune humoral para eliminar la infección. <sup>(29,31)</sup>

También se ha visto que la inoculación de estos animales con un biovar humano de *C. trachomatis* sólo produce una infección leve del tracto genital inferior, en el cual la presencia del microorganismo es baja en muestras cervicovaginales y la duración de ésta infección es de corto tiempo; sin embargo suelen existir secuelas postinfección cuando el biovar humano es inoculada en altas dosis directamente en oviductos y / o en los ovarios, se ha visto además que la infección del ratón con serovares humanos es altamente dependiente de un tratamiento previo del animal con progesterona, la cual efectúa un cambio en las etapas del ciclo estral, llevando al ratón a la etapa en la que es más susceptible a la

infección, en cambio con el biovar murino el modelo es menos dependiente de esta hormona especialmente si el microorganismo es inoculado durante 3 días consecutivos o si el inóculo consiste de altas dosis.<sup>(32-35)</sup>

En relación a lo anterior Ito et al,<sup>(35)</sup> determinaron que la infección por *Chlamydia* en el ratón es ciclo dependiente, ya que sólo puede establecerse durante los siguientes 3 periodos específicos del ciclo estral: metaestro-2, diestro y proestro; etapas en las cuales los leucocitos se encuentran presentes y funcionan como indicadores de que el epitelio cervical se ha regenerado, y es en el diestro que el epitelio es más delgado y la estructura de la membrana celular aún no está bien definida por lo que en esta etapa los ratones son más susceptibles a la infección. En cambio durante las etapas restantes (estro y metaestro-1) el epitelio comienza a engrosar a varias capas, las capas externas comienzan a degenerar y una amplia capa de células escamosas se forma, ésta capa comienza a desplazarse debido al desprendimiento de la mayoría de las células superficiales y es así como las capas de células escamosas y el desprendimiento de éstas pueden evitar el acceso del microorganismo a células basales del epitelio.

#### 2.4. RESPUESTA INMUNE DEL HUÉSPED DURANTE LA INFECCIÓN POR *C. trachomatis*.

Se ha demostrado que la inoculación de *C. trachomatis* por vía vaginal en ratonas y cobayas produce una respuesta inflamatoria mixta de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) y células mononucleares en los primeros 5 días de la infección, sin embargo al décimo día el infiltrado celular es predominantemente de macrófagos y linfocitos T ó B. <sup>(2,30)</sup>

Los LPMN, macrófagos y monocitos son la primera defensa contra bacterias, virus y parásitos, los cuales son ingeridos y eliminados mediante mecanismos oxidativos y enzimáticos. Se ha observado que otro mecanismo para eliminar a *Chlamydia* después de una infección primaria o de una reinfección en el tracto genital de las ratonas, está dado por células TCD4 y TCD8. <sup>(2,36)</sup>

Las células CD4 confieren niveles significativos de protección en contra de este microorganismo, pues la activación local de este grupo de células puede estimular tanto al subgrupo Th1 como al subgrupo Th2, siendo que la respuesta por parte de Th1 estimula la secreción de IFN- $\gamma$ , el cual es un inhibidor in vitro del desarrollo de *Chlamydia*, efecto que es mediado por la disminución de triptófano intracelular, aminoácido esencial para el desarrollo de esta bacteria; así también el IFN- $\gamma$  es un potente activador de macrófagos, los cuales pueden ayudar en el control de la infección por medio de la fagocitosis y la subsecuente eliminación de la bacteria ingerida, a través del reconocimiento de péptidos extraños sobre las moléculas de histocompatibilidad clase II (MHC II). <sup>(36,37)</sup>

En la respuesta por parte de Th2, el mecanismo más probable es la producción de anticuerpos específicos contra ese microorganismo. Se ha observado también, que después de la resolución de una infección primaria y de una infección secundaria las células CD4 estimulan in vitro la secreción de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-6, indicando que las respuestas por parte de los subgrupos Th1 y Th2 están implicadas en adquirir protección inmune en contra de una infección por *C. trachomatis* en la mucosa del tracto genital.<sup>(36)</sup> Las células CD8 participan junto con las células CD4 en la producción de IFN- $\gamma$ , además de que son capaces de reconocer el antígeno de *Chlamydia* presentado por el MHC I para su posterior eliminación.<sup>(38-40)</sup>

Estudios por citometría *in situ* revelan que al 3<sup>er</sup> día después de la infección se comienzan a observar células CD4 y CD8, en la mucosa del epitelio vaginal y en la lámina propia, para el día 7 el epitelio mucoso del útero y la lámina propia contienen células CD4 y células CD8, así como células de tipo mioide, entre el día 14 y 21 postinfección el grupo de células CD4 puede observarse a lo largo de los oviductos y es más numeroso que el grupo de células CD8.<sup>(41)</sup>

Por otro lado, durante una infección por *C. trachomatis* en el ser humano la inducción de una respuesta específica de anticuerpos tipo IgM contra el LPS y la MOMP, se produce aproximadamente 2 a 3 semanas después del contacto con la bacteria, para posteriormente surgir anticuerpos IgG. Estos anticuerpos pueden inhibir la entrada del cuerpo elemental (CE) bloqueando receptores celulares o modificando la carga de éste, además la mucosa genital también puede responder a la infección produciendo anticuerpos de tipo IgA secretorios, los cuales bloquean al microorganismo en el sitio de entrada, o bien inhibiendo la adherencia del CE neutralizando así la infección, no obstante los títulos de

estos anticuerpos neutralizantes regularmente son bajos por lo que no se logra el control de la infección.<sup>(14,42,43)</sup>

La respuesta serológica de parte del huésped ante una infección por *Chlamydia* suele ser más evidente entre personas con vida sexual promiscua pues las concentraciones basales de anticuerpos IgG en estas personas son elevadas en relación con los perfiles de anticuerpos que se desarrollan en infecciones genitales agudas o crónicas, se ha llegado a considerar que las infecciones superficiales sostienen un estímulo muy precario en la formación de anticuerpos, mientras que las infecciones genitales complicadas y profundas se encuentran asociadas a la seroconversión.<sup>(12)</sup>

Debido a que los anticuerpos de tipo IgM tienen un tiempo de vida corto no es frecuente encontrar títulos elevados, sin embargo los anticuerpos IgG suelen permanecer un tiempo relativamente largo, debido a esto funcionan como referencia para establecer (siempre y cuando se cuenten con datos clínicos de infección o de una disfunción reproductiva) si se trata de un contacto anterior o bien si es una infección activa producida por *Chlamydia*, es así que este tipo de respuesta humoral depende del serotipo de *Chlamydia*, localización y gravedad de la infección así como también de la respuesta del individuo.<sup>(12)</sup>

No obstante a lo anterior ha surgido una gran controversia sobre la participación de la respuesta inmune humoral durante una infección por este microorganismo, ya que hay datos en modelos animales que señalan a la inmunidad mediada por células como la más importante.<sup>(44)</sup>

Por ejemplo en cobayas inmunosuprimidas, éstas presentan una infección más prolongada, en comparación con cobayas normales, cuando son infectadas por vía vaginal con el agente de la conjuntivitis de inclusión (GPIC, *C. psittaci*), así también se demostró

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

que los animales normales producían anticuerpos que los protegían de una reinfección, llegando así a la conclusión de que la inmunidad humoral es esencial para la recuperación de una infección por GPIC (agente de la conjuntivitis de inclusión en cobayos). También demostraron que cobayas con una respuesta humoral disminuida, no lograban eliminar con eficacia al microorganismo, al ser re infectados con GPIC a pesar de que la respuesta celular se encontraba elevada.<sup>(45)</sup>

Estudios realizados en ratones atímicos (nu/nu) muestran que estos son más susceptibles a la infección producida por el agente de neumonitis en el ratón (MoPn), que los ratones normales (nu/+); los ratones atímicos no cuentan con anticuerpos que ayuden a combatir la infección por este microorganismo, en cambio los ratones normales desarrollan de forma significativa anticuerpos específicos de tipo IgG e IgA en contra de este biovar murino, también se ha visto que ratones atímicos que han recibido trasplantes de timo (antes de ser infectados con el microorganismo en cuestión) de neonatos de 6 semanas son capaces de desarrollar una respuesta de anticuerpos y que tanto estos como los ratones (nu/+) presentan una protección contra una posible reinfección, lo anterior demuestra que los anticuerpos desempeñan una importante función en la resolución de la infección.<sup>(46-48)</sup>

Se ha determinado en modelos animales que los anticuerpos de tipo IgM aparecen a los 7 días posteriores a la inoculación, ocurriendo un cambio al isotipo IgG en el día 14, alcanzando un punto máximo a los 56 días.<sup>(44)</sup> Así también ensayos de Western blot revelan la presencia de anticuerpos IgM e IgG específicos para la MOMP así como para la proteína de 60 kDa y el LPS, lo cual indica que la respuesta frente a la infección es específica y que protege de infecciones subsecuentes.<sup>(49,50)</sup>

Por su parte Pal et al, encontraron anticuerpos para la proteína hsp 60 kDa en el suero de ratonas infectadas con el agente MoPn, por vía vaginal así como también la

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

---

presencia de anticuerpos de tipo IgM específicos para *C. trachomatis* a los 3 días posteriores a la inoculación, alcanzando un máximo en 2 semanas y disminuyendo subsecuentemente, encontrando además anticuerpos de tipo IgG durante la segunda semana posterior a la infección. Los hallazgos de reactividad cruzada entre la proteína hsp 60 kDa del microorganismo y la 60 kDa del huésped proponen un posible mecanismo para la patogénesis de la infección por *Chlamydia*.<sup>(51)</sup>

Con los datos anteriores es de suponerse que la infección por *C. trachomatis* serovar MoPn en las ratonas es fácilmente controlada tanto por la respuesta inmune humoral como por la celular, sin embargo el empleo de serovares de *C. trachomatis* diferentes a MoPn pueden comportarse de manera distinta, ya sea induciendo una mayor respuesta humoral o celular, o bien ambas.

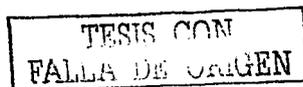
Por ello este proyecto determinó el efecto de la infección por una cepa humana de *C. trachomatis* productora de tracoma, sobre la producción de anticuerpos tratando de elucidar si ésta es más importante que la respuesta celular, en este tipo de serovar de *C. trachomatis*.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

*C. trachomatis* es un microorganismo que se presenta en las enfermedades de transmisión sexual, en el mayor de los casos de manera asintomática lo que hace difícil su detección, afecta a hombres, mujeres, así como a neonatos y eventualmente puede incrementar el riesgo de infertilidad tanto en hombres como en mujeres.

Para el análisis de estos padecimientos se han empleado modelos animales como cobayos, monos y ratones, siendo estos últimos los más empleados para este fin, sin embargo los estudios están enfocados al desarrollo de salpingitis e infertilidad con un serotipo de *C. trachomatis* adaptada al ratón (cepa MoPn) y muy pocos estudios están enfocados al desarrollo de la respuesta inmune con cepas humanas.

Este estudio se enfocó al desarrollo de la respuesta inmune humoral en un modelo de ratón empleando una cepa aislada de humanos (D UW/C3X), para tratar de determinar las diferencias encontradas con los modelos anteriores y poder establecer un modelo en el que se puedan utilizar estas cepas, con el fin de extrapolar los resultados al humano.



#### 4. OBJETIVOS.

##### 4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la participación de los anticuerpos en la eliminación de la infección producida por el serotipo de *Chlamydia trachomatis* D UW/C3X.

##### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la presencia de la infección por *C. trachomatis* en ratonas infectadas por vía vaginal.
- Determinar la presencia de anticuerpos mediante la técnica de inhibición de la fluorescencia en ratonas infectadas con *C. trachomatis* a diferentes tiempos, después de la inoculación.
- Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos (CD4, CD8 y B), en las ratonas durante la infección.
- Analizar la relación entre la presencia de anticuerpos en suero y la presencia del microorganismo en los exudados vaginales.

#### 5. HIPÓTESIS.

- a) El serotipo de *C. trachomatis* D UW/C3X inducirá la producción de anticuerpos anti-*C. trachomatis*.
- b) El serotipo *C. trachomatis* D UW/C3X incrementará el porcentaje de CD4, CD8 y linfocitos B.

## 6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

### 6.1. TIPO DE ESTUDIO.

Este estudio fue de tipo experimental, longitudinal así como prospectivo y se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

### 6.2. POBLACIÓN.

La población de estudio fue un grupo de 12 ratonas de laboratorio BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, libres de microorganismos patógenos las cuales fueron mantenidas en ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, con ventilación y una temperatura entre 22 y 25° C.

### 6.3. CRITERIOS.

*Criterios de inclusión:*

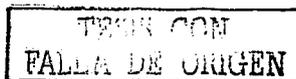
- Ratonas hembras de 25 a 30 gramos de peso y de 6 a 8 semanas de edad.

*Criterios de no inclusión:*

- Ratonas que se encuentren por debajo del peso requerido.
- Ratonas que no tengan la edad requerida.
- Ratonas que presenten algún tipo de infección.

*Criterios de exclusión:*

- Ratonas que dejen de alimentarse.
- Ratonas con infecciones vaginales previas.
- Ratonas con sangrados vaginales.



## 7. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 7.1. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE RATONAS CON *C. trachomatis*.

La cepa que se utilizó fue *C. trachomatis* D UW/C3X, productora de tracoma.

Se inoculó con una micropipeta por vía vaginal, a un grupo de 6 ratonas con aproximadamente 2500 UFI/10  $\mu$ l del serovar D UW/C3X durante 3 días consecutivos, tomando como día cero el último día de inoculación. Un grupo de ratonas no inoculadas se utilizó como testigo negativo, por lo cual estuvieron separadas del grupo de ratonas inoculadas.

Se realizaron tomas de muestras cervicovaginales y sanguíneas a los 7, 21 y 30 días posteriores a la inoculación para la búsqueda de anticuerpos en plasma y presencia del microorganismo en los exudados vaginales.

### 7.2. TOMA DE MUESTRA CERVICOVAGINAL

Se introdujeron 50  $\mu$ l de solución salina (0.85 %, ver apéndice I) por el orificio vaginal, mediante una micropipeta para obtener la capa de epitelio superficial. En 2 portaobjetos limpios y desengrasados se colocaron aproximadamente 25  $\mu$ l de la muestra tomada, y se dejaron secar al aire fijándose posteriormente con metanol.

### 7.3. DETECCIÓN DE CUERPOS ELEMENTALES EN LAS MUESTRAS CERVICOVAGINALES.

A las muestras cervicovaginales de ratonas inoculadas y ratonas no inoculadas ya fijadas se les adicionaron 20  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal fluoresceinado contra *Chlamydia trachomatis* (conjugado) con azul de Evans como colorante de contraste,

dejándose incubar a 37° C por 20 minutos. Después de este tiempo se realizaron 5 lavados de 3 minutos cada uno con solución salina reguladora de fosfatos (PBS, ver apéndice I) para eliminar el exceso de conjugado. Se realizó un último lavado con agua desionizada para quitar residuos de PBS.

Se montaron las preparaciones con medio de montaje y se colocaron cubreobjetos lentamente para evitar la formación de burbujas entre estos y el portaobjetos.

Los portaobjetos se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axiover 100T, Carl Zeiss, Germany), considerándose como positivo la presencia de más de 5 cuerpos elementales por campo.

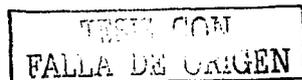
#### **7.4. TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA.**

Para el sangrado de las ratonas se realizó un corte en la cola a nivel de la vena caudal, recuperando la sangre en tubos con heparina (100 UI / $\mu$ l).

Los tubos se centrifugaron a 1500 r. p.m por 10 minutos, posteriormente se separó el paquete celular del plasma. El plasma se guardó a -20° C hasta su uso para la determinación de anticuerpos y el paquete celular se reconstituyó con solución ALSEVER (ver apéndice I), de acuerdo a la cantidad de plasma retirado.

#### **7.5. TÉCNICA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.**

En dos tubos para citometría se colocaron 20  $\mu$ l del paquete celular reconstituido, a un tubo se adicionó 20  $\mu$ l de conjugado anti-CD4 y 20  $\mu$ l de anti-CD8 (anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón FITC y anticuerpo monoclonal anti-CD8 $\alpha$  de ratón R-ficoeritina de Lab Caltag), al segundo tubo, se le adicionó 5  $\mu$ l de anticuerpo fluoresceinado anti-Ig's de ratón



**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO**

(Kirkegaard & Perry Lab, Inc). Los tubos se homogeneizaron y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min.

Transcurrido el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionó 0.5 ml de reactivo de lisis (ver apéndice I) y se agitó durante 1 minuto. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1500 r. p. m por 8 minutos.

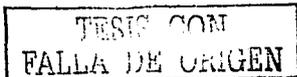
Se eliminó el sobrenadante y al botón celular se le adicionaron 0.5 ml de PBS-azida (ver apéndice I). Se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones.

Terminado el tiempo de centrifugación se decantó la solución y se adicionaron 0.5 ml de solución PBS-azida-formaldehído (ver apéndice I), posteriormente se leyó en un citómetro de flujo (Immuno Cytometry Systems, Becton Dickinson FACScan, San José Ca, U.S.A).

**7.6. TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE FLUORESCENCIA.**

El plasma obtenido anteriormente se diluyó 1:8 (con PBS), y se colocaron 20 µl de la dilución en cada pozo del portaobjetos (Kit Panthfinder *Chlamydia trachomatis* System, Kallestad Diagnostic) el cual contiene dos pozos, uno de ellos tiene células McCoy infectadas con cuerpos elementales inactivados de *Chlamydia* y el otro pozo contiene sólo células McCoy no infectadas. Se empleó un control positivo y un control negativo, contra *C. trachomatis*.

Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a 37° C por 20 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 5 lavados de 3 minutos cada uno con PBS y con agitación para eliminar el exceso de anticuerpos.



Posteriormente se adicionó a cada pozo de las placas 20  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal anti-*C. trachomatis* conjugado a FITC y dirigido contra la MOMP de *C. trachomatis*, se incubaron a 37° C por 20 minutos, transcurrido este tiempo se repitieron los lavados como se describió anteriormente, para eliminar el exceso del conjugado.

Un último lavado con agua desionizada se realizó para eliminar residuos de PBS, posteriormente se montaron las preparaciones con medio de montaje y se colocaron cubreobjetos lentamente para evitar la formación de burbujas entre estos y el portaobjetos.

Los portaobjetos se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 100T, Carl Zeiss, Germany), considerándose positivo a la inhibición de la fluorescencia la ausencia de cuerpos elementales fluoresceinados o bien un número bajo en el conteo de cuerpos elementales en 5 campos revisados.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para datos no paramétricos se utilizó la prueba de U-Mann Whitney. Para datos paramétricos (porcentaje de inhibición de fluorescencia y citometría) se utilizó la prueba de *t-student*.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. PRESENCIA DE CUERPOS ELEMENTALES EN MUESTRAS VAGINALES DE RATONAS INOCULADAS CON *C. trachomatis*

Se consideró una muestra de exudado vaginal como positiva a la infección por *C. trachomatis*, utilizándose como criterio la presencia de 5 ó más cuerpos elementales (CE) y como negativo la presencia de menos de 5 CE, en toda la preparación.

La determinación de CE en muestras vaginales de ratonas inoculadas y no inoculadas con *C. trachomatis* a los tres tiempos de estudio (7,21 y 30 días) se observa en la siguiente tabla.

TABLA 2. PRESENCIA DE CUERPOS ELEMENTALES EN EL EXUDADO VAGINAL DE RATONAS INOCULADAS CON *C. trachomatis*.

GRUPO	0 DÍAS	7 DÍAS	21 DÍAS	30 DÍAS
<i>n</i> = 6 RI	-	+	++	++
<i>n</i> = 6 RNI	-	-	-	-

RI = ratonas inoculadas.

RNI = ratonas no inoculadas

+ = 5 a 7 cuerpos elementales.

++ = 8 a 12 cuerpos elementales.

- = sin presencia de cuerpos elementales.

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO**

En el caso de las ratonas no inoculadas no se observó presencia de cuerpos elementales en los 3 tiempos de investigación, encontrándose únicamente células epiteliales de descamación (figura 1 A), en cambio en las ratonas inoculadas se determinó la presencia de CE fuera de las células epiteliales de descamación así como cuerpos de inclusión (CI) dentro de las células, los cuales eran de forma esférica y color verde manzana brillante en los 3 tiempos de ensayo.

De acuerdo con estas observaciones se determinó la frecuencia de infección en ratonas que fueron inoculadas con *C. trachomatis* (tabla 3): observándose que a los 7 días postinoculación hubo una frecuencia de 4/6 animales positivos a la infección por este microorganismo, los cuales presentaron CE con muy baja fluorescencia (figura 1B). En cambio a los 21 días la frecuencia de ratonas positivas a la infección fue 6/6, además de que se observó fluorescencia brillante de los CE y de los CI presentes en las muestras.

A los 30 días los animales que presentaron CE y CI fueron 6/6, sin embargo algunas muestras presentaron una fluorescencia baja comparada con los días anteriores.

**TABLA 3. FRECUENCIA DE INFECCIÓN VAGINAL DE ANIMALES INOCULADOS CON *C. trachomatis* A DIFERENTES TIEMPOS POSTINOCULACIÓN.**

	7 DÍAS	21 DÍAS	30 DÍAS
FRECUENCIA	4/6	6/6	6/6

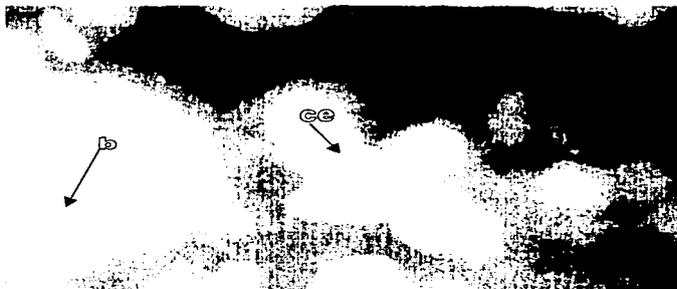
F = Número de animales positivos a la infección/ Número de animales totales en el grupo.

n = 6

Figura 1. Muestras cervicovaginales de ratonas no inoculadas e inoculadas con *C. trachomatis*.



A. Exudado vaginal de una ratona no infectada con *C. trachomatis*, se observan células epiteliales (a).



B. Detección de cuerpos elementales (ce) de *C. trachomatis* en muestra cervicovaginal de ratona a los 7 días postinoculación, también se observa fluorescencia inespecífica (b).

## 9.2. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL PLASMA DE RATONAS INOCULADAS CON *C. trachomatis*.

Para la determinación de anticuerpos anti-*Chlamydia* el plasma de las ratonas fue depositado sobre laminillas que contenían previamente células infectadas con *C. trachomatis*, después del tiempo de incubación se adicionó el anticuerpo anti-*Chlamydia* fluoresceinado, observándose la inhibición de fluorescencia en aquellos casos en donde se detecta la presencia de anticuerpos, los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 2.

La presencia de anticuerpos se evaluó por medio de la técnica de inhibición de fluorescencia teniendo como referencia un control negativo, en el cual no se observó la presencia de CE durante los 3 periodos de estudio (figura 3A) y un control positivo, en el que el promedio de CE observados durante los 3 periodos de ensayo fue de  $30 \pm 2.51$  (figura 3B), la existencia de anticuerpos se estableció de acuerdo al número de CE fluoresceinados por campo de un total de 5 campos en ratonas no inoculadas (figura 3C) y ratonas inoculadas (figura 3D, 3E).

**TABLA 4. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS anti-*Chlamydia trachomatis* EN EL PLASMA DE RATONAS INOCULADAS.**

GRUPO		7 DÍAS ( $\bar{x} \pm ds$ )	21 DÍAS ( $\bar{x} \pm ds$ )	30 DÍAS ( $\bar{x} \pm ds$ )
$n = 6$	RI	18 ± 7	14 ± 4	16 ± 6
$n = 6$	RNI	29 ± 6	28 ± 6	28 ± 3

Los resultados se presentan como el promedio de cuerpos elementales (CE) en 5 campos, por la técnica de inhibición de fluorescencia con una diferencia significativa de  $p \leq 0.05$  con respecto a las no inoculadas.

$\bar{x}$  = media

ds = desviación estándar.

RI = ratonas inoculadas.

RNI = ratonas no inoculadas.

En este caso se observa que el número de CE contados en las placas tratadas con plasma de ratonas inoculadas es a los 7 días de  $18 \pm 7$ , a los 21 días de  $14 \pm 4$  y a los 30 días de  $16 \pm 6$  en comparación con las no inoculadas, en las cuales el promedio de CE fue de  $29 \pm 6$ ,  $28 \pm 6$  y  $28 \pm 3$  respectivamente (figura 2), siendo diferente y estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) en los tres tiempos ensayados.

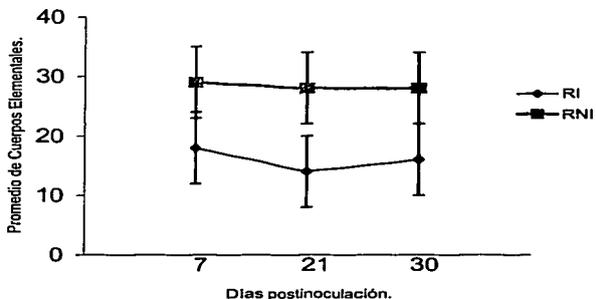
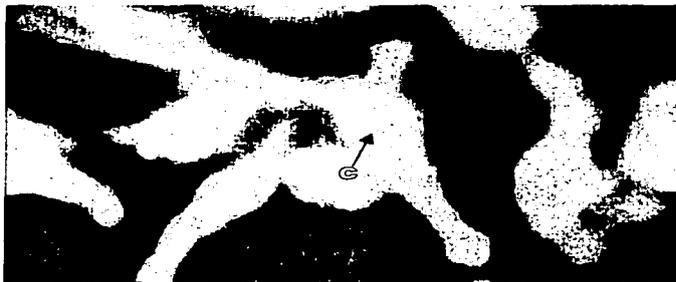
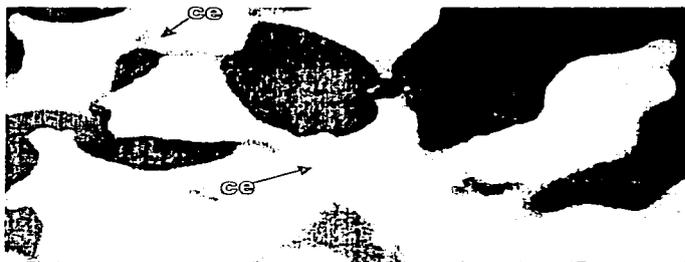


Figura 2. Detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* en el plasma de ratonas inoculadas. Se empleó la técnica de inhibición de fluorescencia (IF) y se evaluó el número de CE tanto en ratonas inoculadas (RI) como en ratonas no inoculadas (RNI) con *C. trachomatis*.

**Figura 3.** Detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* en plasma de ratonas no inoculadas e inoculadas con *C. trachomatis*.



**A.** Inhibición de fluorescencia en plasma, control negativo anti-*C. trachomatis* se observan solamente células McCoy (c).



**B.** Inhibición de fluorescencia en plasma, control positivo anti- *C. trachomatis* se observan cuerpos elementales (ce) dentro de células McCoy.

Figura 3. Detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* en plasma de ratonas no inoculadas e inoculadas con *C. trachomatis*.

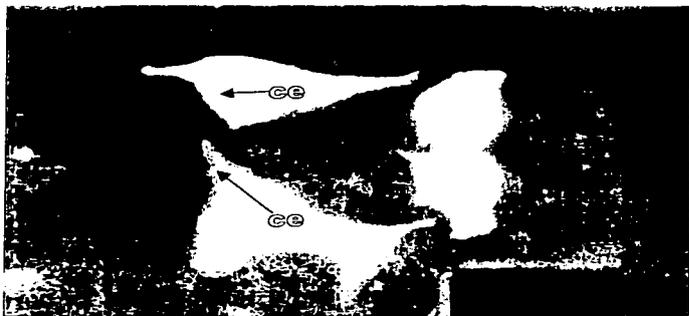


C. Inhibición de fluorescencia en plasma de ratona no inoculada con *C. trachomatis*. Se observan cuerpos elementales (ce) debido a la ausencia de anticuerpos anti-*Chlamydia*.



D. Inhibición de fluorescencia en plasma de ratona inoculada con *C. trachomatis* a los 7 días postinoculación. Se observa la disminución de la fluorescencia de los cuerpos elementales (ce) debido a la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia*.

Figura 3. Detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* en plasma de ratonas no inoculadas e inoculadas con *C. trachomatis*.



E. Inhibición de fluorescencia en plasma de ratona inoculada con *C. trachomatis* a los 30 días postinoculación. Se observa la disminución de fluorescencia de los cuerpos elementales (ee) debido a la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia*.

### 9.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE FLUORESCENCIA EN EL PLASMA DE RATONAS INOCULADAS CON *C. trachomatis*.

Los resultados del porcentaje de inhibición de fluorescencia en muestras de plasma de ratonas inoculadas y no inoculadas con *C. trachomatis*, a diferentes tiempos postinoculación se muestran en la tabla 4 y en la figura 4. En este caso el porcentaje de inhibición de fluorescencia es directamente proporcional a la producción de anticuerpos en los diferentes grupos estudiados.

Se observó en las ratonas inoculadas que a los 7 días postinoculación el porcentaje de inhibición fue de  $36 \pm 7$  en comparación con las ratonas no inoculadas que fue de  $4 \pm 3$  ( $p \leq 0.008$ ). A los 21 días se observó que el porcentaje de inhibición fue de  $58 \pm 5$  mientras que el porcentaje en las ratonas no inoculadas fue de  $18 \pm 7$  ( $p \leq 0.004$ ).

A los 30 días el porcentaje de inhibición en las ratonas inoculadas fue de  $46 \pm 23$ , en cambio las ratonas no inoculadas presentaron un porcentaje de  $5 \pm 9$  ( $p \leq 0.004$ ).

Estos resultados indican que las ratonas inoculadas respondieron a la infección produciendo anticuerpos mientras que en las no inoculadas no hubo producción de anticuerpos en contra del microorganismo en estudio.

**TABLA 5. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE FLUORESCENCIA EN EL PLASMA DE RATONAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS CON *Chlamydia trachomatis* A DIFERENTES TIEMPOS POSTINOCULACIÓN.**

GRUPO	7 DÍAS % IF (x ± estd)	21 DÍAS % IF (x ± estd)	30 DÍAS % IF (x ± estd)
RI	36 ± 7 <sup>a</sup>	58 ± 5 <sup>b</sup>	46 ± 9 <sup>b</sup>
n=6 RNI	4 ± 3	18 ± 7	5 ± 3
n=6			

Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de fluorescencia en 5 campos  
[ ( $p \leq 0.08$ )<sup>a</sup>, ( $p \leq 0.04$ )<sup>b</sup> ]

x = media.

estd = error estándar.

RI = ratonas inoculadas.

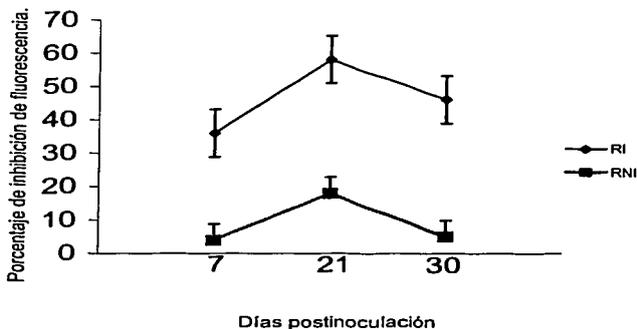
RNI = ratonas no inoculadas.

CE = cuerpos elementales.

% IF = porcentaje de inhibición de fluorescencia.

% Inhibición de Fluorescencia = %F - 100.

% Fluorescencia =  $\frac{\text{Promedio de C. E en 5 campos en el plasma de ratonas inoculadas}}{\text{Promedio de C. E del control positivo}} \times 100$



**Figura 4.** Porcentajes de inhibición de fluorescencia del plasma de ratonas inoculadas y no inoculadas durante la infección por *C. trachomatis*. La figura muestra el porcentaje de inhibición de fluorescencia que presentaron a diferentes tiempos los animales inoculados con *C. trachomatis*.

*RI* = ratonas inoculadas.

*RNI* = ratonas no inoculadas.

#### 9.4. CUANTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TCD4, TCD8 Y B POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Los resultados de la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos por la técnica de citometría de flujo en animales inoculados con *C. trachomatis*, se muestran en la tabla 6 y en las figuras 5, 6 y 7.

Por medio de ésta técnica, se obtuvo el promedio de cada subpoblación de linfocitos a partir del paquete celular de cada animal, tanto basales como en los 3 períodos postinoculación.

TABLA 6. PORCENTAJE DE LINFOCITOS TCD4, TCD8 Y B EN RATONAS INOCULADAS CON *C. trachomatis* A DIFERENTES TIEMPOS DE INOCULACIÓN.

GRUPO (%)	BASALES ( $\bar{x} \pm ds$ )	7 DÍAS ( $\bar{x} \pm ds$ )	21 DÍAS ( $\bar{x} \pm ds$ )	30 DÍAS ( $\bar{x} \pm ds$ )
CD4	28 ± 6	32 ± 12	32 ± 7	24 ± 10
CD8	24 ± 12	19 ± 11	11 ± 7	20 ± 21
B	49 ± 11	33 ± 15	40 ± 8	34 ± 15

(t-student, p estadísticamente no significativa).

n = 6

$\bar{x}$  = media.

ds = desviación estándar.

No obstante que los resultados mostraron un incremento en los porcentajes de linfocitos CD4 a los 7 y 21 días después de la inoculación, estos niveles llegaron a ser

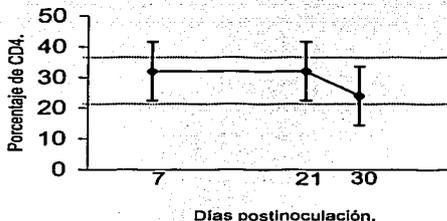
**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO**

ligeramente más bajos a los 30 días; sin embargo se encuentran dentro de los límites establecidos por los valores basales.

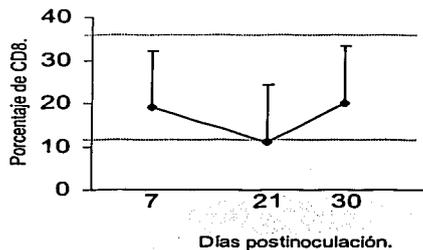
En la población de linfocitos CD8 existieron variaciones durante los 3 períodos, al día 21 se apreció una leve disminución en el porcentaje de estos linfocitos, en comparación con el día 7 y el día 30 los cuales se encuentran dentro de los límites de los valores basales.

En cuanto a los linfocitos B, se observó una disminución a los 7 y 30 días por debajo del intervalo de los valores basales, no obstante para el día 21 existió un ligero aumento en los valores permitiendo que estos quedaran dentro de los límites de los valores basales.

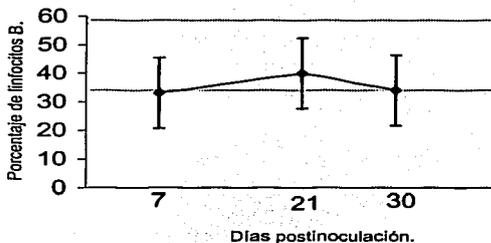
A pesar de las variaciones en las tres poblaciones de linfocitos durante los tres periodos de estudio los datos obtenidos no son estadísticamente significativos.



**Figura 5.** Porcentaje de linfocitos CD4 en ratonas inoculadas con *C. trachomatis* durante la infección. Las líneas punteadas indican los valores basales.



**Figura 6.** Porcentaje de linfocitos CD8 en ratonas inoculadas con *C. trachomatis* durante la infección. Las líneas punteadas indican los valores basales.



**Figura 7.** Porcentaje de linfocitos B en ratonas inoculadas con *C. trachomatis* durante la infección. Las líneas punteadas indican los valores basales.

## 10. DISCUSIÓN.

Se ha descrito que *C. trachomatis* está asociada a una gran variedad de patologías, sin embargo no se han podido establecer los mecanismos por los que se producen éstas enfermedades. Por esto se han utilizado los modelos animales, con el propósito de dar seguimiento a la infección y a la interacción de la respuesta inmune que ésta genera.

En la mayoría de los estudios el ratón es el modelo más empleado, la inoculación vía vaginal con diferentes cepas adaptadas a este animal, como lo es la MoPn, la cual es más virulenta y con un ciclo de replicación más corto (aproximadamente la mitad que el de las cepas humanas de *C. trachomatis*), produce una fuerte respuesta inflamatoria local; en cambio se ha demostrado que las cepas de origen humano al parecer producen una ligera infección en el tracto genital inferior de las ratonas, caracterizada por la presencia del microorganismo durante un corto tiempo; sin embargo la inoculación directa de biovars humanas en el útero, oviductos u ovarios puede causar secuelas severas postinfección,<sup>(29,33)</sup> no obstante hasta hoy día es poco lo que se conoce de la respuesta inmune con estas cepas humanas.

Por ello este estudio trató de determinar la respuesta inmune humoral en ratonas inoculadas con una cepa humana de *C. trachomatis* biovar D UW/C3X (productora de tracoma). Se ha observado en muestras cervicovaginales de mujeres con secuelas por una infección por *C. trachomatis* la presencia de CE y CI utilizando el método de inmunofluorescencia directa, pero debido a que la infección causada por este microorganismo suele desarrollarse de forma asintomática y que sólo se pone de manifiesto cuando comienzan a aparecer las secuelas no se cuenta con datos que indiquen a que

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO**

---

tiempo después del contacto con la bacteria aparecen las inclusiones que son características de este microorganismo. En cambio se sabe que en el ratón las inclusiones del biovar murino (MoPn) se pueden detectar a partir del día 2 al 7 postinoculación, siendo la presencia de estas inclusiones más abundante a partir del día 14, en contraste, la presencia de inclusiones en el tracto genital del ratón por cepas humanas, suelen presentarse en menor proporción y por menos tiempo.<sup>(28-30,35)</sup>

En este trabajo se observó a partir del día 7 postinoculación la presencia de CE en los exudados vaginales, para el día 21 y 30 la presencia de estos CE fue más abundante en comparación con los detectados al día 7. Diversos estudios han demostrado que la presencia de cuerpos elementales (CE), cuerpos de inclusión (CI) así como la frecuencia de infección vaginal en modelos murinos puede verse influenciada por varios factores tales como son: la cepa de *C. trachomatis* utilizada, el modelo animal y la susceptibilidad de los animales a adquirir la infección, en el caso de las ratonas la etapa del ciclo reproductivo en la que se encuentran al momento del estudio, es importante para el establecimiento de la infección.<sup>(29,33,34)</sup>

Un dato muy importante en cuanto al establecimiento de la infección por *C. trachomatis* en el tracto vaginal de las ratonas lo dan a conocer Ito et al,<sup>(35)</sup> quienes reportan que la infección en las ratonas es ciclo-dependiente ya que el estado en el que se obtiene aproximadamente un 50 % de infección es en el diestro seguido por metaestro-2 y proestro, estados del ciclo en que están presentes los leucocitos, los cuales funcionan como indicadores de que el epitelio cervical se ha renovado y es más delgado lo cual sugiere que el microorganismo puede introducirse en la célula e infectarla con mayor facilidad, en las etapas restantes del ciclo el microorganismo no puede entrar con tanta facilidad a las células debido a que el epitelio cuenta con capas celulares más gruesas o bien con células

de descamación que no permiten el establecimiento y desarrollo de *C. trachomatis* en el tracto vaginal de estos animales.

Si bien la infección por el agente MoPn es ciclo dependiente algunos investigadores han utilizado el empleo de progesterona para ciclar a los animales, es decir llevarlos a la etapa del ciclo en la que son más susceptibles a dicha infección, sin embargo el uso de esta hormona puede alterar la respuesta inmunológica en la población de estudio, razón por la cual en este trabajo sólo se inoculó a las ratonas durante 3 días consecutivos con dosis altas de inóculo, pues se ha visto que por medio de este método se logra establecer la infección y se prescinde de cualquier manipulación que pueda alterar los resultados.<sup>(30,32,35)</sup>

En relación a los resultados obtenidos, estos mostraron que en el grupo de ratonas inoculadas durante el primer periodo de ensayo (7 días) la frecuencia de la infección fue de 4/6 animales positivos, esto pudo deberse a que en el momento en que las ratonas fueron inoculadas posiblemente existía una gran actividad regenerativa del epitelio lo que tal vez no permitió el establecimiento del microorganismo en forma activa, pasando este período los CE que se mantuvieron en células de la mucosa encontraron células permisivas para replicarse, por lo que en los períodos restantes (21 y 30 días) se pudo detectar que todos los animales presentaron CE y CI en las muestras vaginales, siendo la frecuencia de infección en este caso de 6/6.

En cuanto a la respuesta inmune humoral, los datos describen que en modelos animales la inoculación con *C. trachomatis* serovar MoPn por vía vaginal produce anticuerpos a partir de los 3 a 7 días siendo bajos estos niveles, en cambio entre los 14 y 28 días la producción se incrementa notablemente, lo que corresponde a una resolución de la infección, la cual se manifiesta con la eliminación del microorganismo a los 30 ó 40 días con la consiguiente disminución de anticuerpos.<sup>(27-30)</sup> Con respecto al humano se ha

demostrado que la producción de anticuerpos aparece a partir de 2 a 3 semanas después del contacto con la bacteria, apareciendo en primer lugar anticuerpos de tipo IgM que disminuyen paulatinamente para dar lugar a los de tipo IgG, que son aquellos que se mantienen hasta que se resuelve la infección.<sup>(52-54)</sup>

Para lograr la detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* en este trabajo se utilizó la técnica de inhibición de fluorescencia, técnica que cuenta con una mayor especificidad que la inmunofluorescencia indirecta, ya que en ésta última los anticuerpos se adherían inespecíficamente lo cual producía falsos positivos en los resultados de este estudio, razón por la cual ésta técnica fue descartada. Sin embargo la técnica de inhibición de fluorescencia presenta la desventaja de que el operador tiene que observar y decidir el grado de fluorescencia que presentan las muestras, además de que éste siempre debe ser el mismo que observe y analice las muestras. En la técnica de inhibición de fluorescencia empleada en este trabajo, el promedio de CE es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos y el porcentaje de inhibición de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en contra de *Chlamydia* que están presentes en el plasma de los animales, ya que estos se unen a los CE de la preparación y producen una disminución en la unión del anticuerpo monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis* fluorescicinado (figura 2 y 4). Los resultados muestran que la mayor cantidad de anticuerpos anti-*Chlamydia* en el grupo de ratonas inoculadas fue al día 21 postinoculación, disminuyendo al final del estudio (30 días) lo que podría estar indicando la resolución de la infección en este último período, lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía en donde se menciona que la mayor producción de anticuerpos es en un período de 14 a 21 días, en cuanto a la única diferencia encontrada en este estudio en comparación con otros, es que al parecer la cepa de origen humano utilizada en este estudio puede resultar tan virulenta como lo es la MoPn, ya que es

capaz de desarrollar una respuesta inmunológica de parte del huésped para resolver la infección, la cual generalmente es resuelta por los ratones a los 30 días.<sup>(28)</sup> En el grupo de ratonas no inoculadas se observó un pico en la producción de anticuerpos a los 21 días, lo cual puede deberse a un fenómeno inflamatorio por la utilización de un cuerpo extraño en la toma de muestra. Futuros estudios son recomendables ampliando el tiempo de seguimiento para observar los cambios en el porcentaje de fluorescencia y compararlos así con los obtenidos en este estudio.

Por otro lado existen estudios previos en los que demuestran que después de una infección por *C. trachomatis* en el tracto genital, se produce una respuesta inmune *in situ* en la cual los linfocitos TCD4 son esenciales contra *Chlamydia*, éste subgrupo se ha encontrando en el infiltrado leucocitario vaginal aproximadamente a los 10 días postinfección y ofrece protección contra el microorganismo en una infección primaria así como en una secundaria. Otro subgrupo que es reclutado al sitio de infección son los linfocitos CD8, los cuales eliminan a las células infectadas. Se ha observado también que aproximadamente a los 7 días, posteriores al contacto con el microorganismo comienza a presentarse una variación en ambas poblaciones de manera local, encontrando un ligero aumento de CD4 y siendo casi imperceptible la variación de CD8; sin embargo entre el día 14 y el día 21 el porcentaje de CD4 es mucho más abundante que el de CD8.<sup>(41)</sup>

En la bibliografía se cuenta con datos de variaciones en las poblaciones de linfocitos CD4, CD8 y B a nivel de cervix, en ellos las variaciones son significativas, quizá en nuestro estudio estos resultados no fueron estadísticamente significativos debido a que la población de estudio era pequeña o por que la cepa utilizada no produce cambios de manera sistémica, por lo cual se recomienda para estudios posteriores enfocarse en los porcentajes locales y de isotipos de anticuerpos que se pueden producir a nivel de cervix.

La utilización de otros biovars de *C. trachomatis*, así como de otras cepas de ratonas además del estudio de los órganos en estos animales podría indicarnos también lo que ocurre con pacientes humanos, con lo cual se podría esclarecer la participación de la respuesta inmune en la producción de patologías causadas por *C. trachomatis*.

## 11. CONCLUSIONES.

En el grupo de ratonas inoculadas, la producción de anticuerpos contra *C. trachomatis* presentó un pico máximo a los 21 días postinoculación, además del mayor grado de infección en este mismo período.

A los 30 días postinoculación en el grupo de ratonas inoculadas las concentraciones de anticuerpos disminuyeron ligeramente, ya que la infección comenzó a resolverse.

No se observaron cambios significativos de forma sistémica en subpoblaciones de linfocitos TCD4, TCD8 y B en las ratonas inoculadas con la cepa de *C. trachomatis* biovar D UW/C3X.

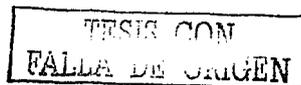
## 11. REFERENCIAS.

- 1.- Bustos L. H. H, Vázquez J. M. E, Arredondo G. J. L, Lira P. J, Beltrán Z. M y Guerra I. F. Prevalencia de *C. trachomatis* en pacientes con esterilidad y embarazo no complicados. *Perinatol. Reprod. Hum.* (1995); 9:227-234.
- 2.- Guerra I. F y López H. M. Mecanismos inespecíficos en la eliminación de *Chlamydia trachomatis*. Aspectos microbiológicos y fagocitosis. *Perinatol. Reprod. Hum.* (1999); 13 : 205 -213.
- 3.- Cates W and Wasserheit N. J. Genital *Chlamydial* infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am. J. Obstet Gynecol.* (1991);164:1771-1781.
- 4.- McEvoy G. K, Litvak K, Welsh O. H. Contraceptives In: American hospital formulary service drug information. Ed Staff, USA, 1997:2381-2390.
- 5.- Mahmoud E. A, Svensson L. O, Olsson S. E and Mardh P. A. Antichlamydial activity of vaginal secretion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1995);172:1268-1272.
- 6.- Brunham R. C, Kuo C. C, Cles L and Holmes K. K. Correlation of host immune response with quantitative recovery of *Chlamydia trachomatis* from the human endocervix. *Infect. Immun.* (1983);39:1491-1494.
- 7.- Raulston E. J, Paul R. T, Knight T. S and Wyrick B. P. Localization of *Chlamydia trachomatis* heat shock proteins 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line in vitro. *Infect Immun.* (1998);66:2323-2329.
- 8.-Toye B, Laferriere C, Claman P, Jessamine P, and Peeling R. Association between antibody to the *Chlamydia* heat-shock protein and tubal infertility. *J. Infect Dis.* (1993);168:1236-1240.

- 9.- Arno N. J, Yuan Y, Cleary E. R and Morrison P. R. Serologic responses of infertile women to the 60-kd *Chlamydial* heat shock protein (hsp 60). *Fertil Steril.* (1995);64:730-735.
- 10.- Domeika M, Domeika K, Paaononen J, Mardh A. P and Witkin S. S. Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *J. Infect. Dis.* (1998);177:714-719.
- 11.- Sziller I, Witkin S. S, Ziegert M, Csapó Z, Ujházy A and Papp Z. Serological responses of patients with ectopic pregnancy to epitopes of the *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein. *Hum. Reprod.* (1998);13:1088-1093.
- 12.- Land A. J, Johannes L. H. E and Goossens J.V. How to use *Chlamydia* antibody testing in subfertility patients. *Hum. Reprod.* (1998);13:1094-1098.
- 13.- Murray R. P, Kobayashi S. G, Pfaller A. M and Rosenthal S. K. (Eds) *Chlamydiae*. En: *Microbiología Médica*. Harcourt Brace, Madrid 2ª edición. (1997):371-380.
- 14.- Caldwell D. H and Perry J. L. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.*(1982);38:745-754.
- 15.- Robinson T. D and Thomas J. B. The role of *Chlamydia trachomatis* in genital tract and associated diseases. *J. Clin. Pathol.* (1980);33:205-233.
- 16.- Thompson E. S and Washington E. A. Epidemiology of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis*. *Epidemiol. Rev.* (1983);5:96-123.
- 17.- Moller R. B, Ahrons S, Laurin J and Mardh A. P. Pelvic infection after elective abortion associated with *Chlamydia trachomatis*. *Obstet Gynecol.* (1982);59:210-213.
- 18.- Bereman M. S, Harrison R. H, Boyce T. W, Haffner J. J. W and Lewis M. Low birth weight, prematurity and postpartum endometritis association with prenatal cervical

- Mycoplasma hominis* and *Chlamydia trachomatis* infections. JAMA. (1987);257:1189-1194.
- 19.- McGregor A. J and French I. J. *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy. Am. J. Obstet Gynecol. (1991);164:1782-1789.
- 20.- Mardh A. P, Johansson H. J. P and Sverhnsen N. Intrauterine lung infection with *Chlamydia trachomatis* in a premature infant. Act. Pediatr. Scand. (1984);73:569-572.
- 21.- Yescas B. G, Udaeta M. E, Arredondo J. L, Guerra I. F, Chávez G. C y Joachim R. H. Conjuntivitis neonatal por *Chlamydia trachomatis*. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. (1993);50:570-576.
- 22.- Yuriko F. M. E, Meguro F, Solórzano S. F, Rendón M. E, Zúñiga V. G, Guerra I. F y Aranda L. A. R. Neumonitis por *Chlamydia trachomatis* en lactantes. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. (1994);51:597-600.
- 23.- Faro S. *Chlamydia trachomatis*: female pelvic infection. Am. J. Obstet Gynecol. (1991);164:1767-1770.
- 24.- Gencay M, Koskiniemi M, Saikku P Puolakkainen M, Raivio K, Koskela P and Vaheri. *Chlamydia trachomatis* seropositivity during pregnancy is associated with perinatal complications. Clin. Infect. Dis. (1995);21:424-426.
- 25.- Paukku M, Tulppala M, Puolakkainen M, Anttila T and Pavoncen J. Lack of association between serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* and a history of recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. (1999);72:427-430.
- 26.- Witkins S. S, Jeremias J, Toth M and Ledger J. W. Cell mediated immune response to the recombinant 57-kDa heat-shock protein of *Chlamydia trachomatis* in women with salpingitis. J. Infect. Dis. (1993);167:1379-1383.

- 27.- Kuo C. C and Chen J. W. A mouse model of *Chlamydia trachomatis* pneumonitis. J. Infect. Dis. (1980);141:198-202.
- 28.- Barron L. A, White J. H, Rank G. R and Soloff S.B, Moses B.E. A new animal model for the study of *Chlamydia trachomatis* genital infections: infection of mice with the agent of mouse pneumonitis. J. Infect. Dis. (1981);143:63-66.
- 29.- Morré A. S, Lyons M. J, and Morrison P. R. Letters to the editor. Murine models of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection: use of mouse pneumonitis strain versus human strains. Infect. Immun. (2000);68:7209-7211.
- 30.- De la Maza M. L, Pal S, Khamesipour A and Peterson M. E. Intravaginal inoculation of mice with the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis biovar results in infertility. Infect. Immun. (1994);62:2094-2097.
- 31.- Swenson E. C, Donegan E and Schachter J. *Chlamydia trachomatis*-induced salpingitis in mice. J. Infect. Dis. (1983);148:1101-1107.
- 32.- Ramsey H. K, Cotter W. T, Salyer D. R, Miranpuri S. G, Yanez A. M, Poulsen E. C, Dewolf L. J, Byrne I. G. Prior genital infection with a murine or human biovar of *Chlamydia trachomatis* protects mice against heterotypic challenge infection. Infect. Immun. (1999);67:3019-3025.
- 33.- Perry L. L, Su H, Feilzer K, Messer R, Hughes S, Whitmire W and Caldwell D. H. Differential sensitivity of distinct *Chlamydia trachomatis* isolates to TNF- $\gamma$ -mediated inhibition. J. Immun. (1999);162:3541-3548.
- 34.- Tuffrey M, Falder P, Gale J and Robinson T. Salpingitis in mice induced by human strains of *Chlamydia trachomatis*. Br. J. Exp. Path. (1986);67:605-616.



DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

- 35.- Ito I. J, Harrison R, Alexander R. E, Billings J. L. Establishment of genital tract infection in the CF-1 mouse by intravaginal inoculation of a human oculogenital isolate of *Chlamydia trachomatis*. *J. Infect. Dis.* (1984);150:577-581.
- 36.- Su H and Caldwell D. H. CD4<sup>+</sup> T cells play a significant role in adoptive immunity to *Chlamydia trachomatis* infection of the mouse genital tract. *Infect. Immun.* (1995);63:3302-3308.
- 37.- Starnbach N. M, Bevan J. M and Lampe F. M. Protective cytotoxic T lymphocytes are induced during murine infection with *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* (1994);153:5183-5189.
- 38.- Magee M. D, Williams M. D, Smith G. J, Bleicker A. C, Grubbs G. B, Schachter J and Rank G. R. Role of CD8<sup>+</sup> T cells in primary *Chlamydia* infection. *Infect. Immun.* (1995);65:516-521.
- 39.- Williams M. D, Grubbs G. B, Paek E, Kelly K and Rank G. R. Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* (1997);65:2876-2882.
- 40.- Su H, Feilzer K, Caldwell D. H and Morrison P. R. *Chlamydia trachomatis* genital tract infection of antibody-deficient gene knockout mice. *Infect. Immun.* (1997);65:1993-1999.
- 41.- Morrison G. S and Morrison P. R. In situ analysis of the evolution of the primary immune response in murine *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect. Immun.* (2000);68:2870-2879.
- 42.- Pal S, Theodor I, Peterson M. e and De la Maza M. L. Immunization with an acellular vaccine consisting of the outer membrane complex of *Chlamydia trachomatis* induces protection against a genital challenge. *Infect. Immun.* (1997);65:3361-3369.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS FUE  
DE LA BIBLIOTECA

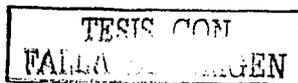
- 43.- Peeling R, Maclean W. I and Brunham C. R. In vitro neutralization of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibody to an epitope on the major outer membrane protein. Infect. Immun. (1984);46:484-488.
- 44.- Ramsey H. K, Soderberg F. S and Rank G. R. Resolution of *Chlamydial* genital infection in B-cell-deficient mice and immunity to reinfection. Infect. Immun. (1988);56: 1320-1325.
- 45.- Rank G. R and Barron L. A. Humoral immune response in acquired immunity to *Chlamydial* genital infection of female guinea pigs. Infect. Immun. (1993);39:463-465.
- 46.- Williams M. D, Schachter J, Grubbs B and Sumaya V. C. The role of antibody in host defense against the agent of mouse pneumonitis. J. Infect. Dis. (1982); 145:200-205.
- 47.- Barron L. A, Rank G. R and Moses B. E. Immune response in mice infect in the genital tract with mouse pneumonitis agent (*C. trachomatis* biovar). Infect Immun. (1984);44:82-85.
- 48.- Rank R. G, Soderberg L. S. F and Barron A. L. Chronic *Chlamydia* genital infection in congenitally athymic nude mice. Infect. Immun. (1985); 48:847-849.
- 49.- Ramsey H. K, Newhall J. W and Rank G. R. Humoral immune response to *Chlamydial* infection of mice with the agent of mouse pneumonitis. Infect. Immun. (1989);57:2441-2446.
- 50.- Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand J. E, Seieux C and Vischer T. L. *Chlamydial* serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J. Clin. Microbiol. (2001);39:1368-1377.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

---

- 51.- Pal S, Fielder J. T, Petterson M. E and De la Maza L. M. Analysis of the immune response in mice following intrauterine infection with the *C. trachomatis* mouse pneumonitis biovar. *Infect. Immun.* (1993);61:772-776.
- 52.- Anestad G, Lunde O, Moen M and Dalaker K. Infertility and chlamydial infection. *Fertil Steril.* (1987);48:787-790.
- 53.- Brunham C. R, Peeling R, Maclean I, Kosseim L. M and Paraskevas M. *Chlamydia trachomatis* -associated ectopic pregnancy: serologic and histologic correlates. *J. Infect Dis.* (1992);165:1076-1081.
- 54.- Jones B. R, Ardery R. B, Hui L. S and Cleary E. R. Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. *Fertil Steril.* (1982);38:553-558.
- 55.- Stites P. D, Ter I. A y Parslow G. T. *Inmunología básica y clínica. El manual moderno*, 9ª ed, México. (1998);272-274, 305.
- 56.- Henry B. J. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. Ed Masson S. A, 9ª edición, (1998);29, 896.
- 57.- Bell A. T, Kuo C. C, Stamm E. W, Tam R. M, Stephens S. R, Holmes K. K and Grayston T. J. Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant *Chlamydia trachomatis* infections. *Pediatr.* (1984);74:224-228.
- 58.- Thomas J. B, Evans R. T, Hawkins D. A and Robinson T. D. Sensitivity of detecting *Chlamydia* elementary bodies in smears by use of a fluorescein labelled monoclonal antibody: comparison with conventional *Chlamydial* isolation. *J. Clin. Pathol.* (1984);37:812-816.



DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO

---

- 59.- Chernesky A. M, Mahor B. J, Castriciano S, Mores M, Stewar O. I, Landis J. S, Seidelman W, Sargeant J. E and Leman C. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J. Infect Dis.* (1986);154:141-148.
- 60.- Guerra I. F, Medina F. S, López H. M, González S. I. E y Arredondo G. J. L. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de tres reactivos de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. *Ginecología y Obstetricia de México.* (1994);62:368-373.
- 61.- Thejls H, Gnarpe J, Gnarpe H, Larson G. P, Christensen J. J. P, Østergaard L and Arne V. Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. *Genitourin Med.* (1994);70:300-303.
- 62.- López H. M y Guerra I. F. M. Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el diagnóstico. *Perinatol. Reprod. Hum.* (2002);16:139-149.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 13. APÉNDICE I REACTIVOS.

#### SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA 0.85 %

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

#### SOLUCIÓN SALINA ALSEVER.

Glucosa	20.5 g
Citrato de sodio	8.0 g
Ácido cítrico 2H <sub>2</sub> O	0.55 g
Cloruro de sodio	4.2 g
Agua bidestilada c.b.p.	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 110° C por 10 minutos.

#### SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATOS PBS 0.1 M pH 7.4.

Cloruro de sodio	8 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de sodio	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Ajustar a pH de 7.4 con ácido clorhídrico concentrado.	
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

**SOLUCIÓN PBS-AZIDA.**

Azida de sodio	0.02 g
Solución PBS 0.1 M	100 ml

**SOLUCIÓN PBS-AZIDA-FORMALDEHIDO.**

Solución de formaldehído al 10%	26 ml
Solución PBS-Azida	74 ml

**SOLUCIÓN DE LISIS.**

Solución de lisis (Kit FACS Lysing Becton Dickinson Immunocytometry Systems)	10 ml
Agua desionizada	90 ml

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 14. APÉNDICE II TÉCNICAS.

##### CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría es un método sensible, rápido y preciso donde se puede valorar cuantitativamente datos inmunofenotípicos en poblaciones celulares específicas, lo que permite realizar el análisis en sangre total o en linfocitos preparados.

Los citómetros de flujo son instrumentos que pueden analizar las propiedades de células únicas al pasar a través de un orificio a gran velocidad, las mediciones que se realizan son: características físicas como tamaño, volumen, índice de refracción y viscosidad.<sup>(55)</sup>

El principio por el cual opera un citómetro es por una corriente de células sueltas que fluyen a través de dos placas cargadas electrostáticamente, las cargas sobre cada tipo de célula son diferentes de ahí que el flujo de distintos tipos de células sea derivada a ángulos diversos a medida que fluye a través del campo potencia entre las placas.<sup>(56)</sup>

Las moléculas de la superficie celular se detectan fácilmente mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, estas propiedades se reconocen al medir disgregación de luz, volumen Coulter y fluorescencia.

El uso de fluorocromos en la misma muestra, de colores distintos acoplado cada uno a un anticuerpo particular permite la fluorescencia simultánea de dos colores en células individuales, y con la aplicación de una metodología de lisis de sangre entera, pueden diferenciarse los principales elementos celulares de la sangre (linfocitos, monocitos, granulocitos).<sup>(55)</sup>

La citometría de flujo ha tenido muchas aplicaciones en la inmunología por ejemplo: a) análisis y separación de subpoblaciones de células T por anticuerpos fluorescentes monoclonales; b) separación de varias clases de células linfoides por el tamaño y marcador de anticuerpos, por mencionar sólo algunas (figura 1 y 2).

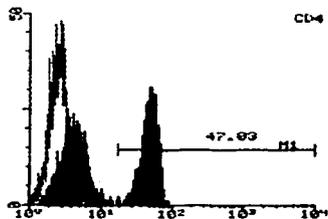


Figura 1. Subpoblación de linfocitos CD4.

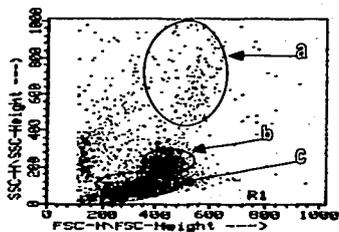


Figura 2. Poblaciones celulares en una muestra de sangre total de ratona.

(a) LPMN, (b) monocitos, (c) linfocitos.

### TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *C. trachomatis*.

Durante mucho tiempo el diagnóstico para *C. trachomatis* ha sido el cultivo celular (células HELA 299 o McCoy), más recientemente los métodos en los que se detecta la presencia del antígeno son: inmunofluorescencia (directa e indirecta), inmunoensayo enzimático, hibridación de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La inmunofluorescencia se puede aplicar como una técnica histoquímica o citoquímica, para la detección y localización de antígenos en células o tejidos, en este caso el anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, sin alterar su reactividad inmunitaria y dar como resultado un trazador sensible para antígenos.<sup>(55)</sup>

El método de inmunofluorescencia (IF) para el diagnóstico de *Chlamydia* en cervix pone de manifiesto la presencia de cuerpos elementales (CE) y cuerpos de inclusión (CI), es una prueba rápida, simple y accesible para los laboratorios que no pueden realizar el cultivo celular. La sensibilidad de esta técnica se encuentra entre un 70 a 100%, mientras que la especificidad oscila entre 95 y 100%, comparada con el cultivo celular que es de 70 a un 80% de sensibilidad y la especificidad se encuentra entre un 98 a un 100%<sup>(57-61)</sup>

Otro método de detección es la micro-inmunofluorescencia (MIF) prueba serológica capaz de detectar la respuesta especie específica y serovar específica, con un 66 a 70.7% de sensibilidad y de un 70 a un 100% de especificidad, es una prueba que fue desarrollada en 1970 para la clasificación de serovariedades de *C. trachomatis* y actualmente se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos de tipo IgG en pacientes infectados con diferentes serovariedades de *C. trachomatis*.<sup>(12,50)</sup> Para la realización de estas pruebas se emplean antígenos que consisten en cuerpos elementales crecidos en cultivos celulares que son formalinizados y preparados en una suspensión del 1 al 3% y

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DURANTE LA INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* SEROVAR D UW/C3X EN UN MODELO MURINO**

depositados sobre portaobjetos mezclando diferentes serovares (L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>), (B, E y D), (C, H, I, J), (G, F, K) con lo cual aumenta su especificidad. La metodología a grandes rasgos consiste en realizar diluciones seriadas de cada uno de los sueros y colocarlos en cada uno de los serovares, los resultados se determinan basándose en cual antígeno muestra una mayor fluorescencia a una mayor dilución.<sup>(62)</sup>

La inmunofluorescencia indirecta (IFA) puede detectar CE, CR es parecida a la MIF pues el anticuerpo específico de la muestra se fija a un antígeno en fase sólida para posteriormente cuantificar el grado de fluorescencia, esta técnica cuenta con una sensibilidad de un 100 % y una especificidad de 81 % y es muy útil para detectar una infección activa.<sup>(62)</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN